



بررسی اثر ضد التهابی سیمواستاتین بر روی سلولهای عصبی تیمار شده با پرکسید هیدروژن

## Evaluation of Anti-inflammatory Effects on simvastatin in Neural Stem Cells Treated with Hydrogen Peroxide



علوم پزشکی قزوین



منابع



اطلاعات تفصیلی



مجری و همکاران



صفحه نخست سامانه

چاپ صفحه

مجریان:

کلمات کلیدی: سلول های عصبی، سیمواستاتین، استرس اکسیداتیو



اطلاعات کلی طرح

کد طرح	۱۴۰۰۱۸۸۲
عنوان فارسی طرح	بررسی اثر ضد التهابی سیمواستاتین بر روی سلولهای عصبی تیمار شده با پرکسید هیدروژن
عنوان لاتین طرح	Evaluation of Anti-inflammatory Effects on simvastatin in Neural Stem Cells Treated with Hydrogen Peroxide
کلمات کلیدی	سلول های عصبی، سیمواستاتین، استرس اکسیداتیو
نوع طرح	
نوع مطالعه	
مدت اجراء - روز	۱۴۴
ضرورت انجام تحقیق	امروزه به خوبی اثبات شده است که شرایط اکسیداتیو استرس، منجر به بهم خوردن دسته وسیعی از فرآیندهای سلولی شده و از این طریق

باعث اختلال در تکثیر سلولی و مهار آن می گردند. علاوه بر این، شواهد در حال افزایش، حاکی از این است که رادیکال های آزاد بویژه رادیکال های اکسیژن به عنوان واسطه های عمومی در فعالسازی مسیرهای مختلف مرگ سلولی محسوب شده و مطالعات مختلف نشان داده اند که نوع مرگ سلولی القاء شده توسط آنها به شدت به آسیب اکسیداتیو و نوع سلول متاثر بستگی دارد. در مطالعات گذشته اثبات شده است که استاتین ها به وسیله بیان PGC-1 $\alpha$  و Nrf2 جلوی آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو القا شده به وسیله پراکسید اکسیژن به سلول را میگیرند. پراکسید هیدروژن پیش ساز گونه های فعال اکسیژن یا ROS بویژه رادیکال هیدروژن می باشد در این مطالعه با این هدف و با نگرش به موارد ذکر شده، تاثیرات القایی اکسیداتیو استرس را بر روی بیان ژنهای PGC-1 $\alpha$  و Nrf2 و میزان مرگ و میر در سلولهای عصبی مورد بررسی قرار خواهیم داد.

هدف کلی	بررسی اثر ضدالتهابی سیمواستاتین بر روی سلولهای عصبی تیمار شده با پراکسید هیدروژن
خلاصه روش کار	سلولهای عصبی در فلاسک کشت داده می شوند. سلولهای عصبی در محیط کشت تا پاساژ سوم در محیط های کشت حاوی سیمواستاتین و پراکسید هیدروژن 30% کشت داده می شوند. در این بررسی درصد سلول های زنده و مرده در پاساژ 3 مشخص میگردد. بیان ژنهای PGC-1 $\alpha$ و Nrf2 به روش RT-PCR مورد بررسی قرار می گیرد. از ژن Beta2 Microglobulin به عنوان کنترل داخلی استفاده میشود.

#### اطلاعات مجری و همکاران

نام و نام خانوادگی	سمت در طرح	نوع همکاری	درجه تحصیلی	پست الکترونیک
رویا ورمزیار	همکار		کارشناسی ارشد	roya.varmaziyar@yahoo.com

#### اطلاعات تفصیلی

عنوان	متن
چکیده طرح	در طرح ذکر گردیده است
پیشینه طرح	در طرح ذکر گردیده است.
فهرست کلی فصول	در طرح ذکر گردیده است.
هدف از اجرا	' بررسی اثر ضدالتهابی سیمواستاتین بر روی سلولهای عصبی تیمار شده با پراکسید هیدروژن '
فرضیات یا سوالات پژوهشی	-میزان بیان Nrf2 در سلولهای عصبی در معرض پراکسید هیدروژن قرار گرفته افزایش می یابد. 2- میزان بیان PGC-1 $\alpha$ در سلولهای عصبی در معرض پراکسید هیدروژن قرار گرفته افزایش می یابد. 3- سیمواستاتین باعث افزایش بقای سلولی در استرس اکسیداتیوی می شود و پس از رنگ آمیزی با تریپان بلو در صد مرگ و میر کمتری مشاهده می شود.
چه موسساتی می توانند از نتایج طرح استفاده نمایند؟	ندارد

کلید واژه های فارسی	سیمواستاتین، سلولهای عصبی، استرس اکسیداتیو
روش پژوهش و تکنیک های اجرایی	<p>سلولهای عصبی در فلاسک کشت داده می شوند. هنگامی که تراکم سلول های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، سلول ها پس از شستشو با PBS به وسیله (Trypsin ۰.۲۵% (Germany, Merck و EDTA ۰.۰۴% (Germany, Merck از کف فلاسک کنده شده و پس از سانتریفوژ در ۱۵۰۰ دور در دقیقه جمع آوری شده و سلول ها پاساژ داده می شوند. سلولهای عصبی در محیط کشت تا پاساژ سوم در محیط های کشت حاوی سیمواستاتین، سیمواستاتین و پراکسید هیدروژن ۳۰٪ کشت داده می شوند. در پاساژ سوم، تعداد ۵۰۰۰ سلول به طور مساوی در هر یک از خانه های پلیت ۲۴ خانه ای لامل گذاری شده ریخته می شود. سلولها در محیط کشت حاوی مواد زیر کشت داده می شوند: DMEM/F۱۲ (GIBCO-BRL, Germany) ۲٪ B۲۷ (Invitrogen, Scotland) bFGF (Chemicon, Germany) ۲۰ ng/ml EGF (Sigma, Steinheim) ۲۰ ng/ml در این بررسی درصد سلول های زنده و مرده در پاساژ ۳ مشخص میگردد. برای انجام این بررسی یک حجم سوسپانسیون سلولی و یک حجم مساوی از رنگ تریپان بلو مخلوط و شمارش سلولی با استفاده از لام نتوبار در زیر میکروسکپ اینورت انجام می شود. در این روش رنگ به داخل سلول های مرده نفوذ می کند و به رنگ آبی در می آیند و سلول های رنگ نشده معرف سلول های زنده هستند که با شمارش کل سلول ها و سلول های رنگ شده درصد سلول های زنده به دست می آید. برای انجام RT-PCR ژن های ذکر شده ابتدا پرایمرهای مورد نیاز توسط نرم افزار Gene Runner طراحی میگردد. در این تکنیک RNA کل از سلول های هر گروه به وسیله کیت استخراج RNA extraction kit، استخراج می گردد. به منظور حذف DNA ناخواسته با استفاده از کیت DNase I amplification grade kit (( صورت می گیرد. سپس RNA با استفاده از کیت تولید (cdNA synthesis kit)) و آنزیم کپی برداری معکوس به DNA مکمل (cdNA) تبدیل می شود. سپس cdNA حاصله به روش RT-PCR تکثیر شده، مورد بررسی قرار می گیرد. از ژن Betar Microglobulin به عنوان کنترل داخلی استفاده میشود.</p>
دلایل ضرورت و توجیه انجام کار	افزایش بقای سلولهای عصبی در مواجه با استرس اکسیداتیو
کلید واژه های فارسی بازنگری شده	ندارد
فهرست منابع و مراجع علمی داخلی	ندارد
فهرست منابع و مراجع علمی خارجی	<p>۱. Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germ-line, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. J Neurosci Res ۲۰۰۲; ۶۹(۶):۹۰۸-۹۱۷. ۲. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science ۱۹۹۲; ۲۵۵(۵۰۵۲):۱۷۰۷-۱۷۱۰. ۳. Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A. Brain from bone: efficient 'meta-differentiation' of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. Differentiation ۲۰۰۱; ۶۸(۴-۵):۲۳۵-۲۴۴. ۴. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from</p>

adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* ۲۰۰۴; ۱۱۷(Pt ۱۹):۴۴۱۱-۴۴۲۲. ۵. Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res* ۲۰۰۴; ۷۷(۲):۱۷۴-۱۹۱. ۶. Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res* ۲۰۰۴; ۷۷(۲):۱۹۲-۲۰۴. ۷. Vavrek R, Pearse DD, Fouad K. Neuronal populations capable of regeneration following a combined treatment in rats with spinal cord transection. *J Neurotrauma* ۲۰۰۷; ۲۴(۱۰):۱۶۶۷-۱۶۷۳. ۸. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* ۲۰۰۴; ۱۱۷(Pt ۱۹):۴۴۱۱-۴۴۲۲. ۹. Kunkel-Bagden E, Dai HN, Bregman BS. Recovery of function after spinal cord hemisection in newborn and adult rats: differential effects on reflex and locomotor function. *Exp Neurol* ۱۹۹۲; ۱۱۶(۱):۴۰-۵۱. ۱۰. Fuchigami T, Kakinohana O, Hefferan MP, Lukacova N, Marsala S, Platoshyn O, Sugahara K, Yaksh TL, Marsala M. Potent suppression of stretch reflex activity after systemic or spinal delivery of tizanidine in rats with spinal ischemia-induced chronic spastic paraplegia. *Neuroscience* ۲۰۱۱; ۱۹۴:۱۶۰-۱۶۹. ۱۱. Liao JK, Laufs U; Laufs (۲۰۰۵). 'Pleiotropic effects of statins'. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* ۴۵: ۸۹-۱۱۸. doi:۱۰.۱۱۴۶/annurev.pharmtox.۴۵.۱۲.۴۰۳.۰۹۵۷۴۸. PMC ۲۶۹۴۵۸۰. PMID ۱۵۸۲۲۱۷۲. ۱۲. Pedersen, TR (۲۰۱۰). 'Pleiotropic effects of statins: Evidence against benefits beyond LDL-cholesterol lowering'. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. ۱۰ Suppl ۱: ۱۰-۷. ۱۳. FDA Drug Safety Communication: New restrictions, contraindications, and dose limitations for Zocor (simvastatin) to reduce the risk of muscle injury'. Federal Drug Administration. Retrieved ۱۵ January ۲۰۱۳

خلاصه نتیجه اجرای طرح
سابقه علمی طرح و پژوهش‌های انجام شده با ذکر مأخذ به ویژه در ایران
خلاصه طرح طبق اهداف پیش بینی شده
WhatRequirementsAreMet
ملاحظات گروه
ملاحظات ناظر

بیان مسأله و بررسی متون

«سلولهای بنیادی»، سلولهایی با توانایی تقسیم بالا هستند. سلولهای حاصل به انواع مختلف سلولهای دیگر تمایز می‌یابند و ممکن است در مسیر تمایز، مانند سلولهای عصبی، قابلیت تقسیم شدن را از دست بدهند. از سلولهای بنیادی می‌توان در تولید سلولها و نهایتاً بافت‌های مختلف نیز استفاده کرد. امروزه استفاده از این سلولها جهت ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده در حال گسترش است. سلولهای بنیادی را بر اساس میزان توانایی آن‌ها در تولید بافت‌های مختلف، به «تمام توان»، «پر توان»، «چند توان» و «تک توان» تقسیم می‌کنند. تکنولوژی سلولهای بنیادی علاوه بر استفاده از این سلولها جهت درمان بیماری‌ها و ترمیم و نو سازی بافت‌ها، اخیراً روی تولید این سلولها نیز متمرکز شده است. نوبل پزشکی سال ۲۰۱۲ به خاطر کشف روشی برای بازسازی سلولهای بنیادی از سلولهای تمایز یافته، مشترکاً به دکتر جان بی. گوردون (John B. Gurdon) و شینیا یاماناکا (Shinya Yamanaka) اعطا شد. منابع اصلی سلولهای بنیادی شامل: مغز استخوان، بند ناف، پالپ دندان، بعضی بافت‌های چربی و جفت و سیستم عصبی می‌باشد. سلولهای بنیادی عصبی: سلولهای بنیادین عصبی در درمان بیماریهای سیستم عصبی کاربرد گسترده‌ای دارند. امروزه در مطالعات سیستم عصبی نشان داده شده که تمامی انواع سلولهای سیستم عصبی یک منشا مشترک دارند. تعداد و الگوهای رشد و نمو آنها در گونه‌های مختلف با هم تفاوت دارد. به نظر می‌رسد این سلولها جمعیت‌های سلول بنیادی مختلفی را ارائه می‌دهند و تنها یک مدل سلول بنیادی نیستند که در چند مکان توزیع شده باشند. نمو نرمال مغز تنها به تکثیر و تمایز این سلول‌های بنیادی جنینی بستگی دارد. اطلاعات کمی در رابطه با سلولهای بنیادی انسانی وجود دارد. در چند آزمایش نیز سلول‌های بنیادی سیستم عصبی مرکزی انسانی به داخل مغز موش‌ها تزریق شدند، که سبب تمایز آنها به سلول‌های شبه-نورون و گلیا شد (۱). در ۱۹۹۲ در یک مطالعه، محیط کشت بدون-سرمی شامل EGF و FGF۲ برای رشد سلول‌های بنیادی CNS جنینی انسان، ابداع شد (۲). هرچند بیشتر سلولها زنده نمی‌ماندند، هر از چندگاهی، یک تک سلول بنیادی CNS بقاء یافته، تقسیم شده و نهایتاً پس از یک تا دوهفته در محیط کشت، نوروسفر تشکیل می‌دادند. نوروسفرها را می‌شد تقسیم کرد و از نو کشت داد. سلولها به تکثیر ادامه داده و نوروسفرهای جدید می‌ساختند که به این ترتیب، یک سیستم *in vitro* ایجاد شد (مانند سیستمی که برای نوروسفرهای CNS موش ساخته شده بود) که سلولها تا ۲ سال در آن قابلیت بقاء داشتند. وابسته به شرایط کشت، سلولها در نوروسفرها می‌توانند در حالت تمایز نیافته تقسیم شوند (در حضور میتوز) یا تفکیک شده و تمایز یافته (پس از حذف میتوز و اضافه کردن فاکتورهای رشد خاص به محیط کشت) باقی بمانند. سلولهای تمایز یافته اکثراً از آستروسیت‌ها ۷۵٪، نورون‌ها ۱۳٪، و اولیگودندروسیت‌های نادر ۱۰۲٪ تشکیل شده‌اند. در مطالعه ای BMSCs به نوروسفر تبدیل گردید و به وسیله *Noggin* تعداد نوروسفرها افزایش یافت [۳]. سایرین از محیط P۴-۸F برای تولید نوروسفر از BMSCs استفاده کردند [۴-۷]. محیط P۴-۸F حاوی Selenous acid, EGF, insulin, hydrocortisone, phosphoethanolamine, cholera toxin, bovine serum albumin, amino acids, vitamins و bovine pituitary extract می‌باشد. در این تحقیق از B۲۷ استفاده گردید که حاوی antioxidants, و هورمون‌ها می‌باشد، همچنین از bFGF و EGF استفاده گردید، در حالی که سایر ترکیبات در این حد غنی از ویتامین‌ها، هورمون‌ها و آنتی اکسیدان‌ها نمی‌باشند. از نظر ساختاری B۲۷ غنی تر از N۲ و محیط Neurobasal است که دیگران استفاده کرده اند [۸-۱۰]. تولید NSCs از نوروسفر مشتق از ESCs برای اولین بار توسط Reynolds و Weiss شرح داده شد. سیمواساتین یک داروی پایین آورنده چربی خون است. این دارو مهار کننده رقابتی ۳-هیدروکسی، ۳-متیل گلو تاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMG - COA ردوکتاز) است، آنزیمی که تعیین کننده سرعت سنتز کلسترول است. مهار این آنزیم منجر به کاهش سنتز کلسترول در کبد و کاهش غلظت درون سلولی کلسترول می‌شود، این امر باعث افزایش گیرنده های LDL موجود در

سطح هیپاتوسیت ها شده، کلیرانس از جریان خون را افزایش می دهد. مهارکننده های HMG – COA ردوکتاز غلظت کلسترول تام، کلسترول LDL و کلسترول VLDL را در پلاسما کاهش می دهد. همچنین به دلیل کاهش سنتز VLDL باعث کاهش TG می شوند، در حالی که HDL اندکی افزایش یافته یا بدون تغییر می ماند [۱۱]. فارماکوکینتیک: سیمواستاتین یک پیش داروی لاکتونی است که پس از جذب از دستگاه گوارش به فرم فعال بتاهیدروکسی اسید، هیدرولیز می شود. سیمواستاتین در عبور اول از کبد که محل اصلی اثر آن است، تحت تاثیر سیتوکروم p450 و ایزو آنزیم 3A4 قرار می گیرد. ۹۵٪ سیمواستاتین و متابولیت فعال آن در اتصال با پروتئین های پلاسما هستند. سیمواستاتین عمدتاً به صورت انواع متابولیت ها از طریق صفرا دفع می شود و از آنجا که دفع کلیوی آن تنها ۱۵ – ۱۰٪ است، تعدیل دوز در بیماران با نارسایی خفیف تا متوسط کلیوی لازم نیست. نیمه عمر متابولیت فعال آن حدود ۹/۱ ساعت است [۱۲]. سیمواستاتین در درمان انواع هیپرلیپیدمی شامل هایپرکلسترولمی ها، هیپرلیپیدمی مختلط با هیپرلیپوپروتئینمی نوع IIa یا IIb، هیپرتری گلیسریدمی (نوع IV) و دیس بتا لیپوپروتئینمی اولیه (نوع II)، به منظور کاهش LDL – کلسترول، آپولیپوپروتئین B، TG، و افزایش کلسترول HDL به کار می رود. استاتین ها می توانند به عنوان درمان کمکی در بیماران دچار هیپرکلسترولمی هموزیگوت فامیلی که مقداری فعالیت گیرنده LDL دارند، موثر باشند. همچنین سیمواستاتین به صورت پروفیلاکسی در بیماران هیپرکلسترولمیک مبتلا به بیماری ایسکمی قلبی به کار می رود. نام تجاری معروف این دارو در ایران Zocor می باشد. سیمواستاتین به شکل قرص ۱۰ و ۲۰ میلی گرمی در بازار دارویی ایران وجود دارد [۱۳]. امروزه به خوبی اثبات شده است که شرایط اکسیداتیو استرس، منجر به بهم خوردن دسته وسیعی از فرایندهای سلولی شده و از این طریق باعث اختلال در تکثیر سلولی و مهار آن می گردند. علاوه بر این، شواهد در حال افزایش، حاکی از این است که گونه های واکنشی اکسیژن (ROS) به عنوان مولکول های سیگنالینگ مورد نیاز برای تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی مختلف، دارای نقش و اثر می باشند. رادیکال های آزاد بویژه رادیکال های اکسیژن به عنوان واسطه های عمومی در فعالسازی مسیرهای مختلف مرگ سلولی محسوب شده و مطالعات مختلف نشان داده اند که نوع مرگ سلولی القاء شده توسط آنها به شدت به آسیب اکسیداتیو و نوع سلول متاثر بستگی دارد (۷). تحت شرایط فیزیولوژیکی نرمال، سلول ها تعادل موجود بین میزان ROS داخل سلولی و دفاع آنتی اکسیدانتی را حفظ می کنند. تحت شرایط اکسیداتیو استرس، تجمع ROS داخل سلولی منجر به آسیب به ساختارهای حیاتی سلولی مثل اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدرات ها، پروتئین ها و لیپیدها می گردد. تحقیقات مختلف پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) را به عنوان ماده مناسب جهت القاء اکسیداتیو استرس معرفی کرده اند. در مطالعات گذشته اثبات شده است که استاتین ها به وسیله بیان PGC- $\alpha$  و Nrf2 جلوی آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو القا شده به وسیله پراکسید اکسیژن به سلول را میگیرند. پراکسید هیدروژن پیش ساز گونه های فعال اکسیژن یا ROS بویژه رادیکال هیدروژن می باشد در این مطالعه با این هدف و با نگرش به موارد ذکر شده، تاثیرات القایی اکسیداتیو استرس را بر روی بیان ژنهای PGC- $\alpha$  و Nrf2 و میزان مرگ و میر در سلولهای عصبی مورد بررسی قرار خواهیم داد. به همین منظور تعیین میزان بقای سلولهای بنیادین عصبی به وسیله تریان بلو قبل و بعد از استفاده از سیمواستاتین ارزیابی میگرد. بیان ژنهای PGC- $\alpha$  و Nrf2 به وسیله RT-PCR ارزیابی میگرد.



## منابع

1. Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. J Neurosci Res 2002; 69(6):908-917.

- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult .2  
mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255(5052):1707-1710
- Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa .3  
A. Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons  
with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 2001; 68(4-5):235-244
- Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, .4  
Brenner R et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal  
cells. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 19):4411-4422
- Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, .5  
transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res* 2004; 77(2):174-191
- Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation .6  
protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological  
changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res* 2004; 77(2):192-204
- Vavrek R, Pearse DD, Fouad K. Neuronal populations capable of regeneration following a combined .7  
treatment in rats with spinal cord transection. *J Neurotrauma* 2007; 24(10):1667-1673
- Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, .8  
Brenner R et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal  
cells. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 19):4411-4422
- Kunkel-Bagden E, Dai HN, Bregman BS. Recovery of function after spinal cord hemisection in newborn .9  
and adult rats: differential effects on reflex and locomotor function. *Exp Neurol* 1992; 116(1):40-51
- Fuchigami T, Kakinohana O, Hefferan MP, Lukacova N, Marsala S, Platoshyn O, Sugahara K, Yaksh TL, .10  
Marsala M. Potent suppression of stretch reflex activity after systemic or spinal delivery of tizanidine in rats  
with spinal ischemia-induced chronic spastic paraplegia. *Neuroscience* 2011; 194:160-169
- Liao JK, Laufs U; Laufs (2005). "Pleiotropic effects of statins". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 89– .11  
.118. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095748. PMC 2694580. PMID 15822172
- Pedersen, TR (2010). "Pleiotropic effects of statins: Evidence against benefits beyond LDL-cholesterol .12

.lowering". American Journal of Cardiovascular Drugs. 10 Suppl 1: 10–7

FDA Drug Safety Communication: New restrictions, contraindications, and dose limitations for Zocor .13  
(simvastatin) to reduce the risk of muscle injury". Federal Drug Administration. Retrieved 15 January 2013

---